

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. September 2003 (25.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/077930 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 31/70**, 31/715

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SCHMIEDL, Detlef** [DE/DE]; Fehrbelliner Strasse 49, 10119 Berlin (DE). **RESZKA, Regina** [DE/DE]; Goethestrasse 23, 16341 Schwanebeck (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/00475

(74) Anwalt: **BAUMBACH, Fritz**; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Februar 2003 (15.02.2003)

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

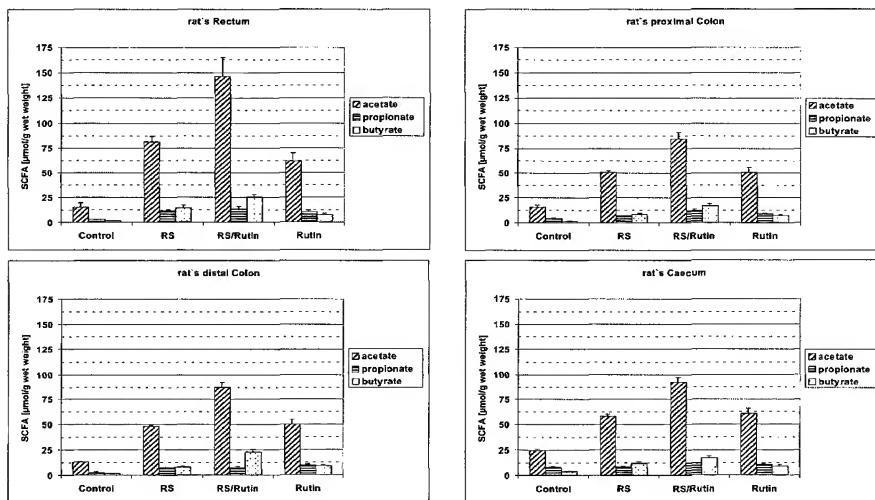
(30) Angaben zur Priorität:
102 12 502.3 20. März 2002 (20.03.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **G.O.T. THERAPEUTICS GMBH** [DE/DE]; Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: USE OF AT LEAST ONE QUERCETINE FLAVONOID FOR INCREASING THE LEVEL OF USEFUL SHORT-CHAIN FATTY ACIDS IN THE LOWER INTESTINAL TRACT

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON MINDESTENS EINEM FLAVONOID DES QUERCETINS ZUR ERHÖHUNG DES SPIEGELS VON NÜTZLICHEN KURZKETTIGEN FETTSÄUREN IM UNTEREN INTESTINALTRAKT



Levels of SCFAs ($\mu\text{mol/g}$ wet = fresh weight) in caecum, proximal and distal colon and rectum of rats, feeding control, RS, RS/Rutin or Rutin containing feed. (MV \pm SEM, Control: n= 6, RS: n=8, RS/Rutin: n=8, Rutin: n=7).

WO 03/077930 A1

(57) Abstract: The invention relates to the use of at least one quercetine flavonoid in combination with at least one saccharide selected among resistant starch (RS), a non-starch polysaccharide, or an oligosaccharide in order to increase in a continuously improved manner the level of useful short-chain fatty acids (SCFA) in the lower intestinal tract and stimulate reabsorption of liquid and dissolved electrolyte.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("*Guidance Notes on Codes and Abbreviations*") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einem Flavonoid des Quercetins in Kombination mit mindestens einem Saccharid ausgewählt aus resisterter Stärke (RS), einem Nichtstärke-Polysaccharid oder einem Oligosaccharid zur kontinuierlich verbesserten Erhöhung des Spiegels von nützlichen kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) im unteren Intestinaltrakt sowie zur Stimulierung der Rückresorption von Flüssigkeit und gelöster Elektrolyte.

VERWENDUNG VON MINDESTENS EINEM FLAVONOID DES QUERCETINS ZUR ERHÖHUNG DES SPIEGELS VON NÜTZLICHEN KURZKETTIGEN FETTSÄUREN IM UNTEREN INTESTINALTRAKT

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einem Flavonoid des Quercetins in Kombination mit mindestens einem Saccharid ausgewählt aus resistenter Stärke (RS), einem Nichtstärke-Polysaccharid oder einem Oligosaccharid zur kontinuierlich verbesserten Erhöhung des Spiegels von nützlichen kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) im unteren Intestinaltrakt sowie zur Stimulierung der Rückresorption von Flüssigkeit und gelöster Elektrolyte.

Eine Reihe von Studien zeigen eine inverse Korrelation zwischen dem Verzehr Ballaststoff-angereicherter Nahrung und dem Kolonkrebsrisiko. Acetat, Propionat und Butyrat - drei der so genannten kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) aus der Gruppe der C2-5 organischen Fettsäuren werden durch anaerobe bakterielle Fermentation unverdaulicher Nahrungsbestandteile z.B. α -Amylase resistenter Stärke (RS) und anderer Ballaststoffe (Inulin, Fructooligosaccharide, β -Glukane u.a.) im Dickdarm von Säugern gebildet. Sie werden durch das Kolonepithel absorbiert. Auf Grund der epidemiologischen Befunde wird eine antineoplastische Rolle für Butyrat postuliert.

Im Dickdarm von Säugern liegen Acetat, Propionat und Butyrat zu ca. 83% der gesamten SCFA mit einer Gesamtkonzentration von ungefähr 100 mM und einem weitestgehend konstanten molaren Verhältnis von ungefähr 60:25:15 vor. Von diesen drei Säuren hat Butyrat den stärksten Effekt auf das Wachstum und die Differenzierung der Kolonozyten, während Propionat geringere Effekte und Acetat keine nachweisbaren Effekte auf das Wachstum und die Differenzierung der Kolonozyten ausübt (1).

Bekannt ist ferner, dass die Gesamtkonzentration und die relative molare Konzentration der individuellen SCFA durch die als Substrat für die mikrobielle Fermentation angebotenen unverdaulichen Kohlenhydrate, Proteine und Ballaststoffarten beeinflusst werden.

So sind z.B. aus EP 0756 828 B1 Diätfasern enthaltende Nahrungszusammensetzungen bekannt, die u.a. geeignet sind, nützliche kurzkettige Fettsäuren (SCFA)

in einem ausgewogenem Anteil und mit ausreichender und gleichmäßiger Geschwindigkeit während des Durchgangs durch Ileum und Dickdarm zu bilden.

Es ist beschrieben, dass eine Erhöhung des Spiegels an SCFA und insbesondere an Butyrat die Inzidenz von Dickdarmerkrankungen wie Krebs und chronischer Entzündungen beeinflusst. Butyrat spielt eine wichtige Rolle für das Wachstum der Kolonmukosa und die Proliferation der Epithelzellen. Dabei übernimmt es zwei Funktionen:

- der größte Teil dient der aeroben Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) der Kolonepithelzellen und wird dabei verbraucht und
- es wirkt als Signalmetabolit, der die Zellmigration und die Proliferation normaler Kolonepithelzellen stimuliert.

Eine Senkung des Butyratspiegels im Kolon führt zu chronischer mukosaler Atrophie. Einläufe mit SCFA-Lösungen erhöhen die mukosale Regeneration, die Kryptenlänge und den DNS-Gehalt der Kolonepithelzellen. (2, 3, 4, 5, 6)

Im Falle einer Entzündung oder von Kolonkrebs ändern sich die funktionellen Eigenschaften des Butyrats in den Kolonzellen. Je mehr die anaerobe ATP-Produktion durch Glykolyse dominiert, desto niedriger ist die Butyratoxidation. Die meisten Daten zu Butyrateffekten stammen von in vitro Experimenten mit Krebszell-Linien. Im Gegensatz zu normalen Epithelzellen inhibiert Butyrat die Proliferation und aktiviert die Apoptose in Krebszellen. Es stimuliert die Expression von Tumorsuppressorproteinen (APC, E-Cadherin). Dadurch bindet mehr β -Catenin an die zelluläre Plasmamembran. Ein anderer Teil des β -Catenin bindet an das im Zytosol lokalisierte APC-Protein. Nach Phosphorylierung des Dimers wird β -Catenin proteolytisch abgebaut. Beide Effekte behindern die Akkumulierung des β -Catenin im Zellkern durch die Onkogenese resultieren würde (7).

Weiterhin beeinflusst Butyrat die Wechselwirkung zwischen Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen, woraus eine Arrestierung der neoplastischen Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus sowie eine Aktivierung der Apoptose resultiert. In Gegenwart von Butyrat und Glucose ist die Expression der Cycline A₁ und D_{2/D₃} gesenkt, während die Expression des Cyclins D₁ steigt. Des Weiteren sind die Cyclin-abhängigen Kinasen cdc2 und cdk2 vermindert, während die Cyclin-abhängigen Kinasen cdk 4 und cdk 6 unverändert bleiben. Entsprechend der Aktivierung der Apoptose sind die zellulären Konzentrationen des proliferierenden Zellkernantigens

(PCNA) sowie bcl 2 (Inhibitor der Apoptose) als auch mutiertes Protein p53 verringert (1).

Im Zusammenhang mit Colitis Ulcerosa und dem kolorektalen Krebs korrelieren erhöhte Level des Laminin Rezeptors mit der Krebsentwicklung. Kolonkrebszellen binden vorzugsweise an Laminin, ein Glycoprotein - Bestandteil der Basalmembran, über Fibronektin oder Kollagen IV. Butyrat reduziert jedoch die Adhärenz von Krebszellen zum Laminin. Es wird angenommen, dass das Enzym Galaktosyltransferase an der Bindung der Krebszellen an das Laminin beteiligt ist. Diese Daten erlauben die Schlußfolgerung, dass eine verstärkte Zelldifferenzierung zu einem verringerten Zugang Laminin-bindenden Proteins an der Basalmembran führt. Es ist bisher nicht bekannt, ob ähnliche Wechselwirkungen bei entzündlichen Prozessen existieren. Jedoch sind Colitis ulcerosa und Dickdarmkrebs durch einen Verlust des Laminin charakterisiert (1, 7).

Es ist darüber hinaus bekannt, dass sich in Abwesenheit von SCFA im Dickdarm von Tieren und Menschen eine entzündliche Erkrankung (Diversion Colitis) entwickelt (8).

Typisch für Patienten mit Colitis ulcerosa und Kolonkrebs sind niedrige Butyratspiegel im Dickdarm sowie dessen häufige Besiedlung mit Sulfatreduzierenden Bakterien (z.B. Desulfovibrio). Diese Bakterien sind für erhöhte Konzentrationen an Sulfiten, Sulfiden und Mercaptanen verantwortlich. Diese Metabolite reduzieren sehr stark die Butyratoxidation, und die Butyrataufnahme der Kolonozyten wird durch 3-Mercaptopropionat kompetitiv gehemmt. Diese Metabolite induzieren weiterhin Veränderungen in der Kryptenarchitektur, die mit solchen bei Colitis ulcerosa vergleichbar sind. In Anwesenheit hoher Butyratspiegel sind diese jedoch umkehrbar (9, 10)

Die Behandlung mittels Butyrateinläufe wurde erfolgreich in einem transmuralen Entzündungsmodell der Ratte (TNBS-Colitis Modell) getestet. Einläufe mit 1ml 80mM Natriumbutyatlösung hatten einen signifikanten therapeutischen Effekt. Durch TNBS-Einwirkung im Rattenkolon entwickeln sich mehr und größere Tumore als nach Azoxymethaneinwirkung (AOM) im Vergleich zu Kontrollen. Auch die Karzinogenese wurde durch Butyrateinläufe im TNBS-Modell unterdrückt. Daneben konnte gezeigt werden, dass sich die im TNBS-Modell herunterregulierte Transglutaminaseaktivität in Kolonozyten durch Butyrateinläufe früher normalisiert (7).

Weiterhin sind Ergebnisse zu einer Reihe von klinischen Studien mit SCFA-Einlauftherapien bei Patienten mit Colitis ulcerosa veröffentlicht. 100 ml einer Lösung, pH 7, die 80 mM Natriumacetat, 30 mM Natriumpropionat und 40mM an Natriumbutyrat und Glukose-frei war, wurde verwendet. Die Ergebnisse zu den Studien an Colitis ulcerosa Patienten waren jedoch weniger aussagekräftig. In einigen Studien wurde der Entzündungsgrad um mehr als 60% reduziert und der Kryptlabel-Index im oberen Kryptenkompartiment sowie die Dichte polymorphkerniger Leukozyten (Neutrophile, Phagozyten) in der Lamina propria der Mucosawand waren signifikant gesenkt. Die Zellproliferation war jedoch allgemein unverändert. Andere Studien zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Placebo- und SCFA-Gruppen. Aber ein positiver Trend wurde nur in den SCFA-Gruppen gefunden. Teilweise traten mehr Fälle einer vollständige Remission oder signifikante Verbesserungen auf.

Kontinuierlich erhöhte luminale Konzentrationen von SCFA und längere Kontaktzeiten sind deshalb unbedingt notwendig für therapeutische Effekte bei Colitis ulcerosa, um pathologische Mechanismen zu überwinden. Eine bekannte Möglichkeit ist die kontinuierliche orale Aufnahme von gutfermentierbarer RS, Inulin, Fruktooligosacchariden oder anderen Ballaststoffen, bei deren Fermentation ausreichend hohe Butyratspiegel gebildet werden, wie auch in EP 0756 828 B1, das Diätfasern enthaltende Nahrungsmittel beschreibt. Als Faserstoffe werden insbesondere lösliche und nichtlösliche Nichtstärke-Polysaccharide, nicht-verdaubare Oligosaccharide und/oder resistente Stärke eingesetzt.

Da ein weiterer kritischer Punkt im Studiendesign die Notwendigkeit verschiedener Co-Faktoren für eine optimale Wirkung von SCFAs ist, zum Beispiel von Glukose für die Bildung von ATP durch Glykolyse und als Substrat für nichopathologische Bakterien, ist resistente Stärke (RS) als ein brauchbares Substrat für die Mehrzahl der intestinalen Bakterien, die Glukose und SCFA produzieren, auch anderweitig beschrieben (bevorzugt RS Typ 1 bis 4 (7,11)). Wie bereits erwähnt, sind Butyrat und Propionat bevorzugte Substrate der aeroben ATP-Bildung der Kolonepithelzellen. Daraus resultiert eine erhöhte energetische Kapazität zelluläre Ungleichgewichte und Störungen der intestinalen Barrierefunktion zu überwinden. Acetat aktiviert die kapillare Blutzirkulation (7).

Insbesondere aus diesen Untersuchungen von Jakobasch et al. (7) am transmuralen Entzündungsmodell der Ratte (TNBS) zum Einfluß oral applizierter resisterter Stärke

auf die Pathogenese ist bekannt, dass in gesunden Kontrollen nach 1-wöchiger RS-Aufnahme (1,5 - 2g RS/ Tag) die SCFA-Spiegel und insbesondere die Butyratspiegel im Kolon signifikant gegenüber gesunden Kontrollen (RS-freies Futter) erhöht waren. Nach Induktion der Entzündung kam es in der RS-freien Gruppe im proximalen und distalen Kolon zu einem signifikant ausgeprägten und in der RS-Gruppe im distalen Kolon zu einem leichten Anstau der SCFA, bedingt durch eine Resorptionsstörung. Berechnete Resorptionsraten erlauben die Schlußfolgerung, dass die induzierte Resorptionsstörung für Butyrat und Propionat schneller abklingt als für Acetat im Laufe des Heilungsprozesses. Unter RS-freier Ernährung waren selbst nach 21 Tagen die Werte für die Acetatabsorption noch nicht normalisiert. Die induzierte Resorptionsstörung für SCFA war im distalen Kolon unter RS-Fütterung signifikant niedriger. Eine allgemeine Normalisierung der Resorption war bereits am 13 Tag nach TNBS-Einwirkung zu verzeichnen. Unter RS-Fütterung war außerdem im proximalen Kolon die Hemmung der SCFA-Resorption vollständig aufgehoben. Histologische Untersuchungen zeigen weiterhin eine schnellere Regeneration der Kryptenstruktur der Kolonwand nach TNBS-induzierter Colitis bei RS-Fütterung.

Neuere Untersuchungen zeigen, daß Butyrat Dosis-abhängig die Aktivierung des NF κ B modulieren kann. So konnte gezeigt werden, daß Butyrat die Entzündungsantwort in Biopsiematerial von CD-Patienten durch Inhibierung der NF κ B-Aktivierung in Immunzellen unterdrückt. Hohe Spiegel an zirkulierenden und mukosalen proinflamatorischen Zytokinen sind charakteristisch für CED (CD u. Colitis ulcerosa). Intestinales Biopsiematerial sowie einkernige Zellen der Lamina propria (LPMC) isoliert aus entzündeter Mukosa von CD-Patienten produzieren mehr IL1 β , IL-6 und TNF als normale Kontrollen. Die TNF-Sekretion konnte Dosis-abhängig durch Butyrat in entzündetem und nichtentzündetem Gewebe vermindert werden. Wobei nach Einstellung 10mM Butyrat-Spiegeln die TNF-Level auf Kontrollwerte sanken. Ähnliche Ergebnisse wurden für IL-6 und weniger deutlich für IL-1 β beobachtet. Weiterhin wurde gezeigt, daß Butyrat über die Runterregulation der mRNA -Expression die Produktion der proinflammatorischen Zytokine in intestinalen Biopsien und isolierten LPMC drosselt (15).

Zirkulierendes bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) kann zu einer Aktivierung von Monozyten (Immunzellen, Haupteffektor der Entzündungsantwort) in Patienten mit CED führen. Allgemein ist bekannt, daß Monozyten eine ganze Reihe von Zytokinen (TNF, IL-1 β , IL-6) als Antwort auf LPS-Stimulation ausschütteten. Die mit LPS durchgeführte Stimulation bewirkte eine gesteigerte TNF-Ausschüttung von einzellkernigen Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Durch Butyrat konnte dieser Effekt unterdrückt werden. Entsprechend senkte Butyrat die Expression von mRNA

für entzündungsfördernde Zytokine in diesen Blutzellen. Verantwortlich hierfür war der in einkernigen Blutzellen (PBMC) und Zellen der Lamina propria (LPMC) nachgewiesene Effekt der Butyrat-vermittelten Unterdrückung der Translokation der aktivierte Form des NFκB. Dieser Effekt war verbunden mit einem Anstieg der IκB-Spiegel (15).

Auf Grund der o. g. Fakten ist es notwendig, kontinuierlich hohe Spiegel an den kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und insbesondere Butyrat im Dickdarm einzustellen.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, weitere geeignete Mittel bereitzustellen, die die Konzentration von SCFA's erhöhen und entzündungshemmende Wirkungen insbesondere im Dickdarm zeigen.

Überraschend wurde gefunden, dass eine kombinierte Gabe von mindestens einem Flavonoid des Quercetins in Kombination mit mindestens einem Saccharid ausgewählt aus resisterter Stärke (RS), einem Nichtstärke-Polysaccharid oder einem Oligosaccharid eine signifikante, kontinuierliche Erhöhung des Spiegels von nützlichen kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) im unteren Intestinalbereich, vorzugsweise im Kolon (Dickdarm), bewirkt, wobei diese kombinierte Gabe einen unerwarteten synergistischen Effekt auslöst.

Flavonoide sind an sich bekannte antiinfammatorische Substanzen. Es sind phenolische Verbindungen, die in höheren Pflanzen weit verbreitet sind und von Mensch und Tier mit der Nahrung aufgenommen werden. Mehr als 500 verschiedene Flavonoide sind derzeit bekannt, wobei Quercetin eins der am häufigsten vorkommenden ist. Flavonoide können als Aglycone, Glykoside und in methylierter Form vorliegen. Im allgemeinen liegen sie jedoch als Glycoside in pflanzlichem Material vor. Verschiedene Zucker können am Aglycon β -glycosidisch gebunden sein. Diese Bindung ist durch Enzyme der intestinalen Mikroflora spaltbar, während dem Säugetierorganismus die entsprechenden Enzyme zur Spaltung der β -glycosidischen Bindung fehlen. Zur Zeit ist weder geklärt, ob die Glycoside oder die Aglycone besser, noch in welchem Ausmaß sie absorbiert werden (7, 14). Wenig ist bisher über den Einfluß der Flavonoide auf die Mukosa des Gastrointestinaltraktes bekannt, mit der sie nach oraler Aufnahme in Kontakt kommen.

Neuere Untersuchungen in der Ussing-Kammer an Epithelgewebe des proximalen Kolon der Ratte zeigen, dass nach serosaler Applikation von 100 μ M

Quercetin der ausschließlich vom Epithel ausgehende aktive Ionentransport (elektrogener Ionentransport), gemessen als Kurzschlußstrom I_{sc} , sowie die Potentialdifferenz (PD) über dem Epithel ansteigt, nach 25min ein Maximum durchläuft und 90 min nach Applikation wieder Ausgangswerte erreicht (12). Dieser Effekt war Konzentrations-abhängig (25 -150 μ M) nachweisbar. Untersuchungen an Epithelgewebe des Jejunum, Ileum und distalen Kolon der Ratte zeigen den gleichen Trend. Im Gegensatz dazu führte die Applikation von Quercetin (100 μ M) auf der mucosalen Seite des Epithelgewebes proximalen Rattenkolons (Lumenseite des Dickdarms) erst nach Entfernen der Schleimschicht (Mucus) auf der mucosalen Seite zu einer signifikanten Veränderung des I_{sc} und der PD.

Flux-Messungen für Na^+ , Cl^- u. HCO_3^- -Ionen zeigten nur für letztere einen Effekt des Quercetin. So wurde nachgewiesen, dass Quercetin signifikant den serosal -> mucosal (s -> m) Cl^- - und HCO_3^- Flux, also die Sekretion von Chlorid- und Hydrogenkarbonat-Ionen steigert.

Als Konsequenz daraus erhöhte Quercetin die Nettochloridsekretion, die dem induziertem Anstieg von I_{sc} entsprach. Eine Behandlung mit dem Chlorid-Kanalblocker 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoësäure (NPPB) verminderte die Quercetininduktion des I_{sc} . Dabei war die Quercetin-induzierte Steigerung von I_{sc} von der extrazellulären Chloridkonzentration abhängig. Des weiteren konnte der Quercetin-induzierte I_{sc} durch Blocker des $Na^+ - K^+ - 2Cl^-$ Co-Transporters (Bumetanide und Azosemide) teilweise inhibiert werden. Im Gegensatz dazu hat das Glycosid 3-Rhamnosyl-glucosyl-Quercetin (Rutin) keinen Einfluß auf I_{sc} und PD unter den gleichen experimentellen Bedingungen (12).

Offensichtlich beeinflußt das Aglycon Quercetin den intestinalen Elektrolyttransport. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu Befunden, die zeigen, dass das Aglycon Quercetin nach intraperitonealer Applikation induzierte Diarröen (PGE_2 oder Castor-oil) und die intestinal Flüssigkeitssekretion im Tiermodell reduziert. Der gleiche Effekt wurde nach oraler Gabe von Quercetin-3-L-Rhamnosit (Quercetin) bei induzierten Diarröen nachgewiesen. Jedoch beeinflußt das Glycosid den Wasser- und Elektrolyttransport unter normalen Bedingungen nicht (13). Auch die orale Aufnahme von Rutin (5- 100mg/kg Körpergewicht) nach TNBS-induzierter Colitis bei Ratten zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Inzidenz von Diarröen im Vergleich mit der Kontrollgruppe (14).

Desweiteren wurde nun gefunden, dass die erfindungsgemäße Kombination von Flavonoiden mit einem o.g. Saccharid zur Stimulierung der Rückresorption von

Flüssigkeit und gelösten Elektrolyten im unteren Intestinaltrakt geeignet ist, was insbesondere bei Diarröen von Bedeutung ist.

Gemäß der Erfindung sind die genannten Substanzen bevorzugt bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) einsetzbar, da insbesondere die Flavonoide a) verschiedene Enzyme, die bei Entzündungen aktiviert sind, inhibieren können, b) eine Reihe von Zellen des Immunsystems *in vitro* runterreguliert werden und c) die meisten Flavonoide potente Antioxidantien und Radikalfänger sind.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante ist das Flavonoid 3-Rhamnosyl-glucosyl quercetin (Rutin).

Anstelle RS, vorzugsweise α -Amylase resistente Stärke, oder zusätzlich zur RS können Nichtstärke-Polysaccharide, vzw. Inulin und β -Glucane, und/oder Oligosaccharide, vzw. kurz- und langkettiges Inulin und Fructooligosaccharide, zugesetzt werden.

Die erfindungsgemäße Verwendung von mindestens einem Flavonoid und mindestens einem Saccharid erfolgt in bevorzugten Mengenverhältnissen. Gemäß der Erfindung wird das Flavonoid in einer Dosierung von 0,05-150 mg/kg Körpergewicht/Tag verwendet, die Anwendung von Sacchariden erfolgt in einer bevorzugten Dosierung von 5-50 g/Tag, vorzugsweise 5-30 g/Tag, besonders bevorzugt 10-15 g/Tag.

Die erfindungsgemäße Kombination bewirkt einen überraschenden synergistischen Effekt und führt zu einer signifikanten Steigerung des SCFA-Spiegels im Dickdarm im Vergleich zur Gabe von Rutin allein und resistenter Stärke allein, vgl. Abb. 4, 5 und 6. Infolge wird die Wiederherstellung der Barrierefunktion des Kolonepithels bei entzündlichen Prozessen begünstigt.

Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch Kombinationspräparate, die mindestens ein Flavonoid des Quercetins, vorzugsweise Rutin, in Kombination mit resistenter Stärke, ggf. mit an sich üblichen Hilfs- und Trägerstoffen umfassen.

Diese Präparate können oral als Nahrungsergänzungsmittel oder in der Nahrung appliziert werden. Alternativ sind die Präparate in Form von pharmazeutischen Darreichungsformen bevorzugt als Tabletten, Pellets, Kapseln, Granula oder

Dragees einsetzbar. In einer anderen bevorzugten Anwendungsform können die Kombinationspräparate auch rektal, vorzugsweise durch Suppositorien, rektale Schaumprodukte und Klistiere, appliziert werden. Ihre Herstellung ist dem Fachmann bekannt.

Die Kombinationspräparate werden insbesondere zur Therapie von mit mangelndem SCFA-Spiegel in Zusammenhang stehenden Erkrankungen oder prophylaktisch z.B. vor Operationen zur Verbesserung der Gewebefestigkeit usw. eingesetzt. Das heißt sie werden zur therapeutischen Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), Morbus Crohn (CD), Colitis ulzera usw. verwendet.

Die Erfindung wird anhand von Beispielen belegt, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll.

Ausführungsbeispiel

Leitfähigkeitsmessungen in der Ussing-Kammer an partiell gestripter, proximaler gesunder bzw. entzündeter Kolonwand zeigen einen signifikanten Einfluß erhöhter SCFA-Spiegel, insbesondere an Butyrat, auf die Barrierefunktion, ausgedrückt als epithelialer Widerstand R^e [$\Omega \cdot cm^2$]. Während unter RS-freier Fütterung am 4. Tag nach induzierter Entzündung die Barriere signifikant gegenüber gesunden Kontrollen erniedrigt war, blieb die epitheliale Barriere in den Gruppen, die höhere Spiegel an SCFA, insbesondere an Butyrat aufwiesen (RS oder RS/Rutin), gegenüber gesunden Tierproben erhalten (Fig. 1, Tab. 1).

Tab. 1.

Resultate der one-way ANOVA für den Epithel-Widerstand (R^e), $\alpha=0,95$; $P<0,05$: signifikante Unterschiede.

Epithelial Resistance R^e ($\Omega \cdot cm^2$)	To group	P
	Control and healthy -> Control 4 th Colitis day	0,0042
	RS and healthy -> RS 4 th Colitis day	0,3751
	RS/Rutin and healthy -> RS/Rutin 4 th Colitis day	0,7069

Untersuchungen zum Einfluß der Fütterungsregime auf den elektrogenen Ionentransport wurden ebenfalls durchgeführt. Die Fütterung RS- bzw. RS/Flav.-haltigem Futter (Rutin) hat erwartungsgemäß keinen Einfluß auf den elektrogenen Ionentransport verglichen mit der Kontrollgruppe, ausgedrückt als Kurzschlußstrom

(short-circuit current: I_{sc}), gemessen an proximaler partiell gestripter Kolonwand gesunder Ratten (Fig. 2). Offensichtlich beeinflußt nur das serosal verabreichte Aglycon Quercetin den elektrogenen Ionentransport. Weiterhin wurden in der Ussing-Kammer Untersuchungen zum Einfluß der Fütterungsregime auf die induzierbare Chloridsekretion durchgeführt. Dazu wurde auf der serosalen Seite Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Theophylin zugesetzt. Die Fütterung von RS- bzw. RS/Flav.-haltigem Futter (Rutin) hat ebenfalls erwartungsgemäß keinen Einfluß auf die durch PGE₂/Theophylin induzierbare Chloridsekretion verglichen mit der Kontrollgruppe, ausgedrückt als ΔI ($\Delta I = I_{gesamt} - I_{sc}$), gemessen an proximaler partiell gestripter Kolonwand gesunder Ratten (Fig. 3).

Die Ergebnisse in den Abb. 1 – 3, zusammenfassend, lassen den Schluß zu, dass die orale Applikation von resisterter Stärke in Kombination mit dem Flavonoid Rutin die Wiederherstellung der Barrierefunktion des Kolonepithels bei endzündlichen Prozessen des Dickdarms erheblich begünstigt, jedoch keinen Einfluß auf den elektrogenen Ionentransport und auf die induzierbare Chloridsekretion ausübt.

In überraschender Weise steigert die kombinierte orale Applikation von RS u. Rutin signifikant die Spiegel der SCFA (µmol/g wet weight) zusätzlich nicht nur im Caecum, sondern auch im proximalen u. distalen Kolon, und insbesondere im Rectum der Ratten verglichen zur Kontroll-, RS- und Rutingruppe (Fig. 4., Tab. 2).

Tab. 2.

Resultate der one-way ANOVA für die SCFAs, $\alpha=0,95$; $P<0,05$: signifikante Unterschiede (c: control, RS: resistente Stärke, Ru: Rutin).

Caecum								
Acetate	To group	P	Propionate	To group	P	Butyrate	To group	P
	C->RS	5,042E-08		C->RS	0,5441235		C->RS	0,0006771
	C->RS/Ru	7,14E-08		C->RS/Ru	0,0008567		C->RS/Ru	0,0001072
	C->Ru	0,0001146		C->Ru	0,0695565		C->Ru	0,0105748
	RS->RS/Ru	1,365E-05		RS->RS/Ru	0,0003301		RS->RS/Ru	0,0589873
	RS->Ru	0,6452309		RS->Ru	0,0652976		RS->Ru	0,2526901
	RS/Ru->Ru	0,0007814		RS/Ru->Ru	0,4224633		RS/Ru->Ru	0,0106874

Proximal colon								
Acetate	To group	P	Propionate	To group	P	Butyrate	To group	P
	C->RS	2,684E-07		C->RS	0,0045425		C->RS	0,0001218
	C->RS/Ru	3,378E-06		C->RS/Ru	0,000319		C->RS/Ru	0,0001988
	C->Ru	0,0002852		C->Ru	0,0021144		C->Ru	0,003171
	RS->RS/Ru	0,0002474		RS->RS/Ru	0,0009167		RS->RS/Ru	0,0113473
	RS->Ru	0,8126215		RS->Ru	0,0174736		RS->Ru	0,405843
	RS/Ru->Ru	0,0066207		RS/Ru->Ru	0,097159		RS/Ru->Ru	0,0137802
Distal colon								
Acetate	To group	P	Propionate	To group	P	Butyrate	To group	P
	C->RS	4,405E-11		C->RS	7,522E-06		C->RS	1,798E-05
	C->RS/Ru	8,498E-08		C->RS/Ru	0,007679		C->RS/Ru	2,242E-05
	C->Ru	6,28E-05		C->Ru	0,0001753		C->Ru	0,0021811
	RS->RS/Ru	7,81E-06		RS->RS/Ru	0,9901259		RS->RS/Ru	0,0001321
	RS->Ru	0,7393625		RS->Ru	0,0266867		RS->Ru	0,5711881
	RS/Ru->Ru	0,0003625		RS/Ru->Ru	0,1135531		RS/Ru->Ru	0,0012513
Rectum								
Acetate	To group	P	Propionate	To group	P	Butyrate	To group	P
	C->RS	1,7336E-06		C->RS	1,045E-05		C->RS	0,0025791
	C->RS/Ru	0,0001075		C->RS/Ru	0,0061545		C->RS/Ru	3,763E-05
	C->Ru	0,0009063		C->Ru	0,0002898		C->Ru	0,004559
	RS->RS/Ru	0,0050582		RS->RS/Ru	0,5125865		RS->RS/Ru	0,0354133
	RS->Ru	0,0772666		RS->Ru	0,6268189		RS->Ru	0,0848852
	RS/Ru->Ru	0,0039579		RS/Ru->Ru	0,4319273		RS/Ru->Ru	0,0008618

Die Spiegel an SCFA können auch auf die Trockenmasse der Lumeninhalte bezogen werden. Die Angabe erfolgt dann in [$\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht]. Der Befund, dargestellt in Abb. 4 ist auch signifikant, wenn die Werte auf die Trockenmasse bezogen werden (Fig. 5.)

Nach Berechnung der molaren Verhältnisse der SCFA aus deren Mittelwerten (Fig. 4) ergibt sich folgendes Bild (Fig. 6).

Aus der Abb. 6 ist ableitbar, dass dem Befund aus Abb. 4 ein synergistischer und kein additiver Effekt zu Grunde liegt, da sich die molaren Verhältnisse der SCFA

Acetat, Propionat und Butyrat zwischen den Gruppen RS, RS/Rutin u. Rutin in jedem Abschnitt des unteren Intestinaltraktes unterscheiden. Besonders deutlich wird dies im distalen Kolon der Ratten.

Konsequenterweise sind die erhöhten Spiegel an Butyrat in der RS/Rutin-Gruppe zum einen auf eine Stimulation der Gesamtproduktion an SCFA zurückzuführen (absolute Steigerung). Zum anderen ist offensichtlich eine RS/Rutin-stimulierte, Darmflora-vermittelte Verschiebung der Produktion zu Gunsten des Butyrats für die Änderung der molaren Verhältnisse an SCFA (relative Steigerung) und für die Gesamtproduktion von Butyrat in dieser Gruppe verantwortlich. Wie auch immer, aus den Abb. 4, 5 u. 6. wird deutlich, dass nach kombinierter Applikation von Rutin und resistenter Stärke (RS) höhere Spiegel an SCFA, insbesondere an Butyrat (absolut und/oder relativ) in den weiter rektalwärts liegenden Darmabschnitten entstehen als nach Applikation von RS oder Rutin bzw. Kontrollfutter allein.

Ein Vergleich der Feuchtegehalte bzw. Trockenmasseanteile in den Darminhalten der einzelnen Abschnitte ergab überraschender Weise folgendes Bild (Fig. 7.).

Der Dickdarm ist ein Organ, in dem u.a. die Resorption von Wasser und darin gelöster Elektrolyte stattfindet. Demzufolge muss sich unter normalen Bedingungen die Trockenmasse des Lumeninhaltes rektalwärts (vom Caecum zum Rektum) erhöhen. Dies ist in Abb. 7 für die Kontrollgruppe anschaulich belegt. Während im Caecum der Kontrollgruppe eine durchschnittliche Trockenmasse von ca. 20% vorliegt, liegt die Trockenmasse im Rectuminhalt bei ca. 40%. Auch in den anderen Gruppen (RS, RS/Rutin, Rutin) ist die Resorption von Wasser an Hand der steigenden Trockenmassen ersichtlich.

Eine besonders ausgeprägte Resorption von Flüssigkeit findet jedoch nur in der RS/Rutin-Gruppe, besonders deutlich im distalen Kolon, statt.

Tab. 3. Resultate der one-way ANOVA, $\alpha=0,95$; $P<0,05$: signifikante Unterschiede.

Dry matter (%) distal colon	To group	P
	Control -> RS/Rutin	0,0007242
	RS -> RS/RS/Rutin	0,000104
	RS/Rutin -> Rutin	0,000925

Bisher veröffentlichte im Stand der Technik diskutierte Ergebnisse belegen jedoch, dass nur serosal appliziertes Quercetin (Aglycon) *in vitro* den Ionentransport in Epithelzellen (jedoch Sekretion von Chlorid und Hydrogenkarbonat-Ionen) stimuliert, während nach oraler Applikation von Rutin (Quercetinglycosid) in Tierexperimenten ein Einfluß auf Ionentransportprozesse im Dickdarm nicht nachweisbar war. In Abb. 7 wird dieses Ergebnis noch einmal bestätigt. Die Resorptionen von Wasser in der Rutingruppe und der Kontrollgruppe sind erwartungsgemäß gleich. Jedoch, und das war sehr überraschend, erfolgt bei kombinierter Applikation von Rutin und RS eine signifikant verstärkte Resorption von Flüssigkeit aus dem Lumen (Tab. 3).

Eine Stimulation der Rückresorption von Flüssigkeit und Elektrolyten im Dickdarm ist immer dann von besonderem Interesse, wenn sie z.B. bei Erkrankungen wie Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Durchfallerkrankungen, Diarröen, Cholera u.a. gestört ist. Die kombinierte Applikation von Rutin und resistenter Stärke könnte demzufolge als Mittel mit antidiarrhötischer Wirkung eingesetzt werden.

Zusammenfassend wird festgestellt:

Insbesondere nach einer kombinierten oralen Applikation von α -Amylase resistenter Stärke (RS) und dem Flavonoid 3-Rhamnosyl-glucosylquercetin (Rutin) gemäß der Erfindung werden signifikant die Spiegel der SCFA (Acetat, Propionat und Butyrat ($\mu\text{mol/g}$ Feuchtgewicht) nicht nur im Caecum, sondern auch im proximalen u. distalen Kolon, und insbesondere im Rectum von Ratten verglichen zur Kontroll-, RS- und Rutingruppe (Fig. 4., Tab. 2) erhöht.

Aus den molaren Verhältnissen der SCFA in den einzelnen Darmabschnitten (Abb. 6) ist ableitbar, dass dem Befund aus Abb. 4 ein synergistischer Effekt zu Grunde liegt, da sich die molaren Verhältnisse der SCFA Acetat, Propionat und Butyrat zwischen den Gruppen RS, RS/Rutin u. Rutin in jedem Abschnitt des unteren Intestinaltraktes unterscheiden. Besonders deutlich wird dies im distalen Kolon der Ratten.

Konsequenterweise sind die erhöhten Spiegel an Butyrat in der RS/Rutin-Gruppe zum einen auf eine Stimulation der Gesamtproduktion an SCFA zurückzuführen (absolute Steigerung). Zum anderen ist offensichtlich eine RS/Rutin-stimulierte, Darmflora-vermittelte Verschiebung der Produktion zu Gunsten des

Butyrats für die Änderung der molaren Verhältnisse an SCFA (relative Steigerung) und für die Gesamtproduktion von Butyrat in dieser Gruppe verantwortlich.

Erfindungsgemäß ist die Stimulation der SCFA-Bildung und insbesondere die Bildung von Butyrat nach oraler Applikation auch dann möglich, wenn an die Stelle der resistenten Stärke ein anderer Ballaststoff, wie z.B. ein Nichtstärke-Polysaccharid Inulin und β -Glucane oder ein Oligosaccharid, wie z.B. hydrolysiertes Inulin und Fructane u.a. im Kombinationspräparat tritt.

Möglich ist dies auch, wenn gemischte Ballaststoffe aus der o. g. Gruppe an die Stelle der RS treten. Des weiteren ist dies möglich, wenn die resistente Stärke im Gemisch mit einem oder mehreren der o.g. Ballaststoffe zusammen mit einem Flavonoid, bevorzugt Rutin oral appliziert wird. Neben der bevorzugten oralen Applikation kann auch die Applikation rektal durchgeführt werden, mittels z.B. einer isotonischen Lösung, die des weiteren Glukose und /oder Fruktose und/ oder Oligomere und/oder Polymere davon und Rutin enthält.

Der Dickdarm ist ein Organ, in dem u.a. die Resorption von Wasser und darin gelöster Elektrolyten stattfindet. Demzufolge muss sich unter normalen Bedingungen die Trockenmasse des Lumeninhaltes rektalwärts (vom Caecum zum Rektum) erhöhen.

Ein Vergleich der Feuchtegehalte bzw. Trockenmasseanteile in den Darminhalten der einzelnen Abschnitte für alle Gruppen (Kontrolle, RS, RS/Rutin, Rutin) ergab überraschender Weise folgendes Bild: Während im Caecum der Kontrollgruppe eine durchschnittliche Trockenmasse von ca. 20% vorliegt, liegt die Trockenmasse im Rectuminhalt bei ca. 40%. Auch in den anderen Gruppen (RS, RS/Rutin, Rutin) ist die Resorption von Wasser an Hand der steigenden Trockenmassen ersichtlich.

Eine besonders ausgeprägte Resorption von Flüssigkeit findet jedoch nur in der RS/Rutin-Gruppe, besonders deutlich im distalen Kolon, statt (Abb. 7, Tab. 3). Der zugrunde liegende Mechanismus dieses Befundes ist bisher ungeklärt. Deutlich wird jedoch, dass es einen ursächlichen Zusammenhang zwischen hohen Spiegeln der SCFA Acetat, Propionat und Butyrat, Glukose (mikrobielle Fermentationprodukte der RS) und dem Flavonoid Rutin oder dessen Abbauprodukten im Kolon der Ratten gibt. Bisher ungeklärt ist, ob das Rutin oder das Aglycon Quercetin nach Abspaltung des Zuckerrestes, von der mukosalen Seite her stimulierend wirkt oder resorbiertes Rutin oder das Aglycon von der serosalen Seite her wirksam wird. Unklar ist auch, ob

die Natrium-Kalium-Pumpe der Epithelzellen stimuliert wird und/oder ein verstärkter Natrium/Wasserstoffprotonen-Austausch stattfindet.

Methoden

1. Zusammensetzung der semisynthetischen Diäten

Tab. 4. Zusammensetzung der Rattennahrung (g/1000g Nahrung)

Ingredientien	Kontrolle	RS	RS/Rutin	Rutin
Verdauliche Wachsmaisstärke	630	530	530	630
Resistente Stärke Typ 3	-	100	100	-
Rutin	-	-	≈ 0,008	≈ 0,008
Casein	200	200	200	200
Sonnenblumenöl	50	50	50	50
Zellulose	50	50	50	50
Mineral Cocktail	50	50	50	50
Vitamin Cocktail	20	20	20	20

2. Charakterisierung der intestinalen Barrierefunktion

Die intestinale Barrierefunktion der partiell gestripten proximalen Darmwand von gesunden Ratten und an einem Colitis-Modell (TNBS) der Ratte wurden mit elektrophysikalischen Messungen in der Ussing-Kammer analysiert entsprechend der Methode beschrieben in (Rohweder, J. et al. In vitro characterization of the intestinal barrier function in two standard models of colitis in rats. Langenbecks Arch Chir. I (Forumband 1997): 439 - 443.)

3. Auslösung von Colitis

Die Colitis wird ausgelöst durch rektale Applikation von Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) in Ethanol (vgl. Rohweder et.al.)

4. Die Bestimmung von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA).

Die SCFAs wurden bestimmt mit der Methode beschrieben in Schmiedl, D. et al., Production of a heat-stable, butyrogenic resistant starch. Carbohydrate polymers, 43, (2000): 183 - 193.

5. Produktion von resistenter Stärke Typ 3 für die Fütterungsstudie

Die verwendete resistente Stärke wurde produziert durch Hitze-Feuchte-Behandlung eines RS₃-haltigen Produktes, so genannte Novelose 330 von

National Starch and Chemical. Diese Methode ist beschrieben in EP 0012 459.

6. Die Bestimmung des RS-Gehaltes.

Der Inhalt von RS wurde ebenfalls nach Schmiedl et al. bestimmt.

7. Die Bestimmung der Trockensubstanz.

200 mg des gefrorenen homogenisierten Inhaltes (Frischgewicht) wurden in einer getrockneten, kleinen Glasflasche mit einem Glasstopfen gewogen und bei einer Temperatur von 105°C 2 Stunden getrocknet. Die heiße Flasche wurde in einem Excikator auf Zimmertemperatur abgekühlt. Die abgekühlte Flasche wurde erneut gewogen. Die Trockensubstanz wurde wie folgt berechnet: 100 * trockenes Gewicht/Frischgewicht = (%). Die Bestimmung wurde wiederholt.

Literatur

- (1) Velazquez, O.C., Lederer, H.M. and J.L. Rombeau
Butyrate and the Colonocyte. Implications for Neoplasia.
Digestive Diseases and Sciences, **41**, No. 4 (April 1996): 727-739.
- (2) Sakata, T.
Influence of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: A possible explanation for trophic effects of fermentable fiber, gut microbes and luminal trophic factors.
Br. J. Nutr., **58**, (1987), 95-101.
- (3) Kripke, S.A. et al.
Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids.
J. Parenter. Enter. Nutr., **13**, (1989), 109-116.
- (4) Janne, P., Carpenter, Y and G. Willems
Colonic mucosal atrophy induced by a liquid elemental diet in rats.
Am. J. Dig. Dis., **22**, (1977), 808-812.
- (5) Koruda, M.J. et al.
Parenteral nutrition supplemented with short-chain fatty acids: Effect on the small-bowel mucosa in normal rats.
Am. J. Clin. Nutr., **51**, (1990), 685-689.
- (6) Friedel, D and G.M. Levine
Effect of short-chain fatty acids on colonic function and structure.
J. Parenter. Enter. Nutr., **16**, (No. 1), (1992), 1-4.
- (7) Jacobasch, G. et al.
Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases.
Int. J. Colorectal Dis., **14**, (1999), 201-211.
- (8) Chapman, M.A.S. et al.
Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis.
Gut, **35**, (1994), 73-76.
- (9) Stein, J. et al.
Mercaptopropionate inhibits butyrate uptake in isolated apical membrane vesicles of the rat distal colon.
Gastroenterology, **108**, (1995), 673-679.
- (10) Pitcher, M.C.L., and J.H. Cummings

Hydrogen sulfide: a bacteria toxin in ulcerative colitis?
Gut, **39**, (1996), 1-4.

(11) Haralampu, S.G.
Resistant starch – a review of the physical properties and biological impact of RS₃.
Carbohydrate Polymers, **41**, (2000), 285 – 292.

(12) Cermak, R., Föllmer, U. and S. Wolffram
Dietary Flavonol quercetin induces chlorid secretion in rat colon.
Am. J. Physiol., **275** (Gastrointest. Liver Physiol. **38**), (1998) :G1166-G1172.

(13) Galvez, J. et al.
Antidiarrhoeic activity of quercitrin in mice and rats.
J. Pharm. Pharmacol., **45**, (1993): 157-159.

(14) Havsteen, B.
Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency.
Biochemical Pharmacology, **32**, (No. 7) (1983): 1141 – 1148.

(15) Segain, J.-P. et al.
Butyrate inhibits inflammatory responses through NF_κB inhibition: implications for Crohn's disease. Gut, **47**, (2000), 397 – 403.

Patentansprüche

1. Verwendung von mindestens einem Flavonoid des Quercetins in Kombination mit mindestens einem Saccharid ausgewählt aus resistenter Stärke, einem Nichtstärke-Polysaccharid oder einem Oligosaccharid zur kontinuierlich verbesserten Erhöhung des Spiegels von nützlichen kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) im unteren Intestinaltrakt.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen zur Erhöhung des Acetat-, Propionat- und/oder Butyratspiegels, insbesondere des Butyratspiegels, verwendet werden.
3. Verwendung von mindestens einem Flavonoid des Quercetins in Kombination mit mindestens einem Saccharid ausgewählt aus resistenter Stärke, einem Nichtstärke-Polysaccharid oder einem Oligosaccharid zur Stimulierung der Rückresorption von Flüssigkeit und gelösten Elektrolyten.
4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Flavonoid 3-Rhamnosyl-glucosyl quercetin (Rutin) verwendet wird.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Saccharide in Kombination eingesetzt werden.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Saccharid eine α -Amylase resistente Stärke verwendet wird.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Nichtstärke-Polysaccharide Inulin und β -Glucane verwendet werden.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Oligosaccharide kurz- und langkettiges Inulin und Fructooligosaccharide verwendet werden.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Flavonoid in einer Dosierung von 0,05-150 mg/kg Körpergewicht/Tag verwendet wird.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Saccharid in einer Dosierung von 5-50 g/Tag, vorzugsweise 5-30 g/Tag, insbesondere 10-15 g/Tag, verwendet wird.
11. Kombinationspräparat umfassend mindestens ein Flavonoid des Quercetins, vorzugsweise Rutin, in Kombination mit mindestens einem Saccharid ausgewählt aus resisterter Stärke, einem Nichtstärke-Polysaccharid oder einem Oligosaccharid als Nahrungsmittel bzw. Nahrungsergänzungsmittel oder zur pharmazeutischen Applikation.
12. Kombinationspräparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es mit an sich üblichen Hilfs- und Trägerstoffen zur oralen oder rektalen Applikation vorliegt.

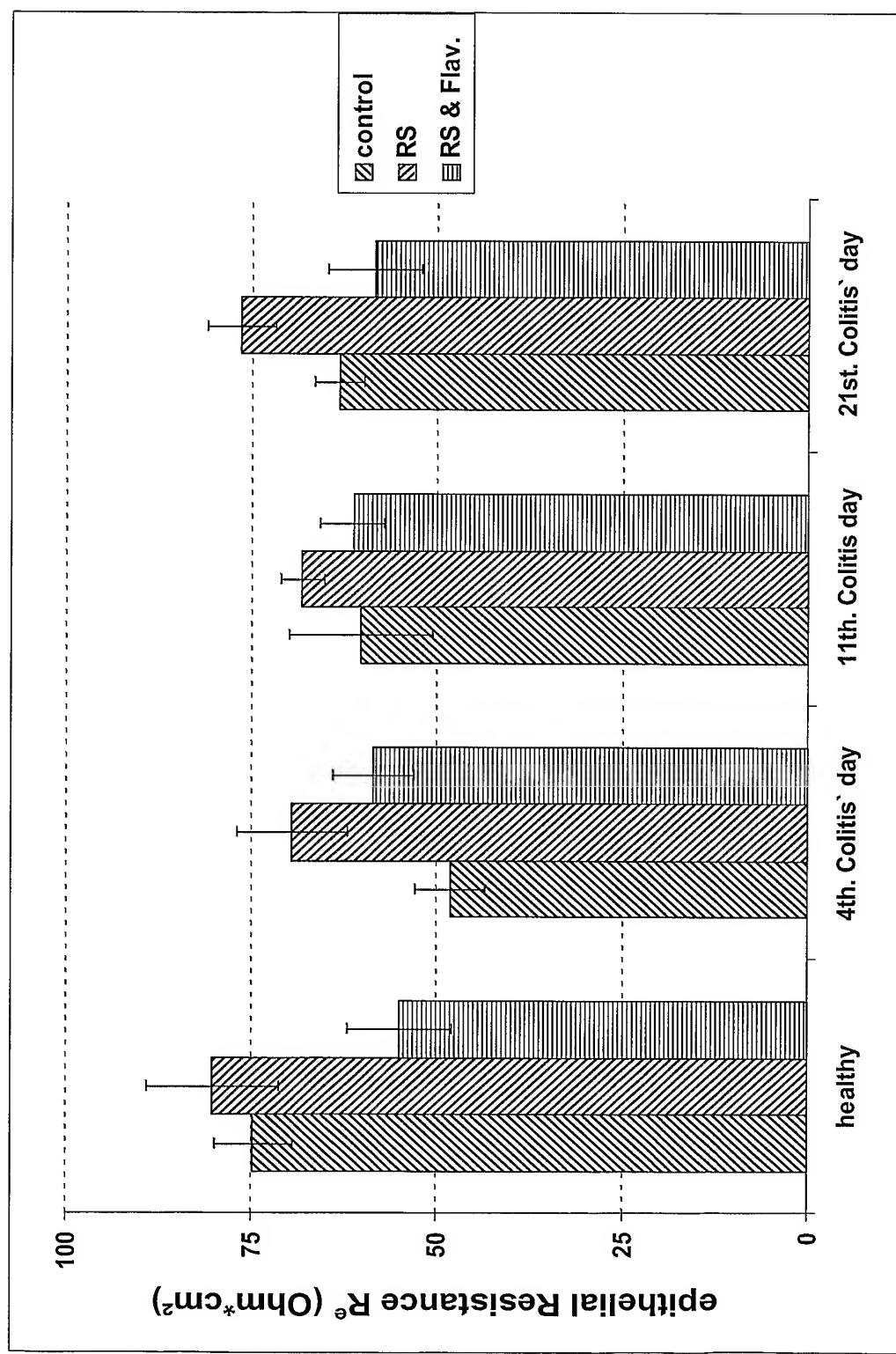


Fig. 1. Epithelial resistance of partially striped proximal colon wall of healthy rats, feeding control, RS or RS/ Flavonoids (rutin) containing feed, and after colitis induction with TNBS. ($MV \pm SEM$, $n=6$).

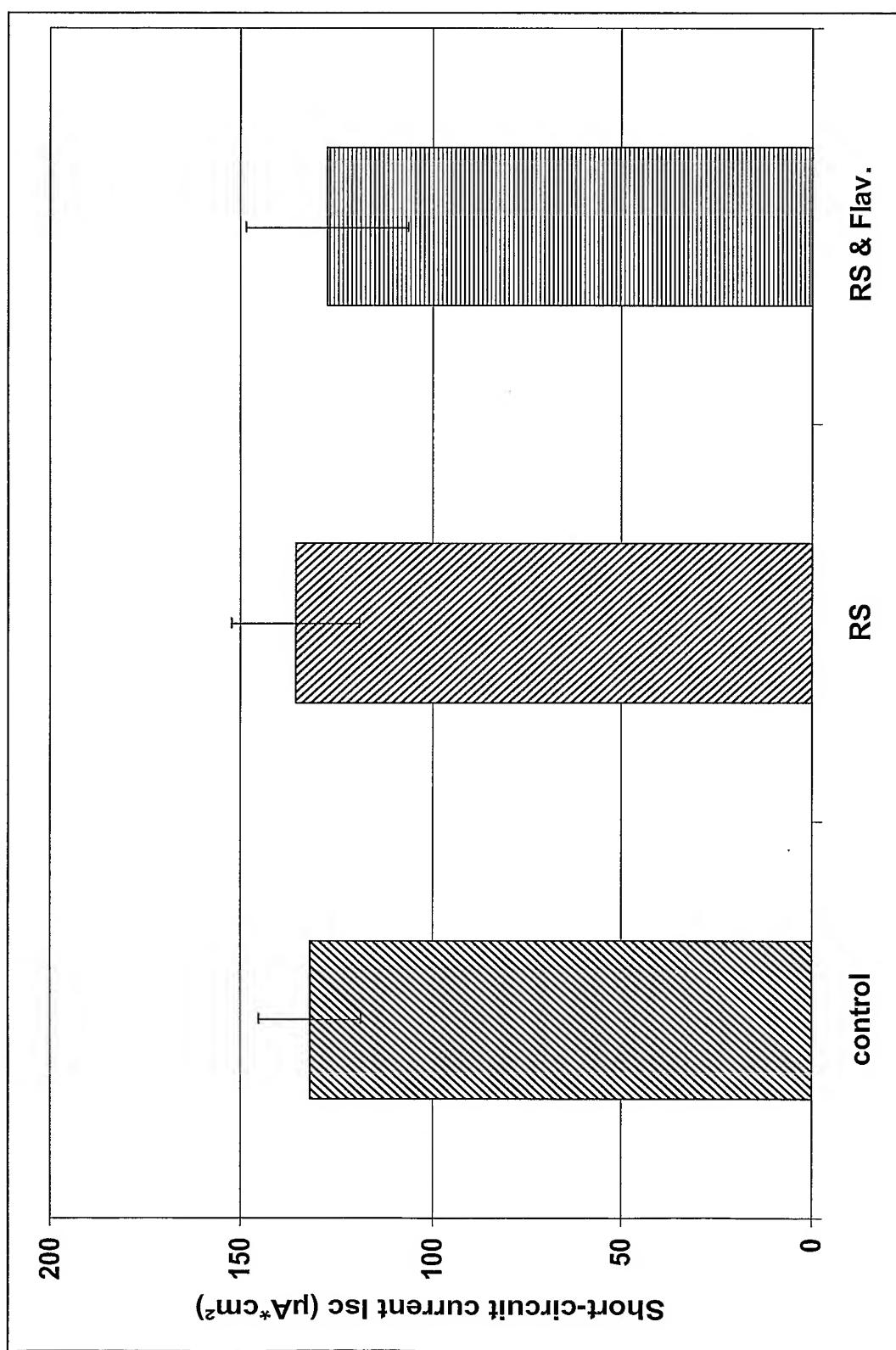


Fig. 2. Short circuit current (I_{sc}) measured on partially striped proximal colon wall of healthy rats, feeding control, RS or RS/Flavonoide (Rutin) containing feed. ($MV \pm SEM, n=6$).

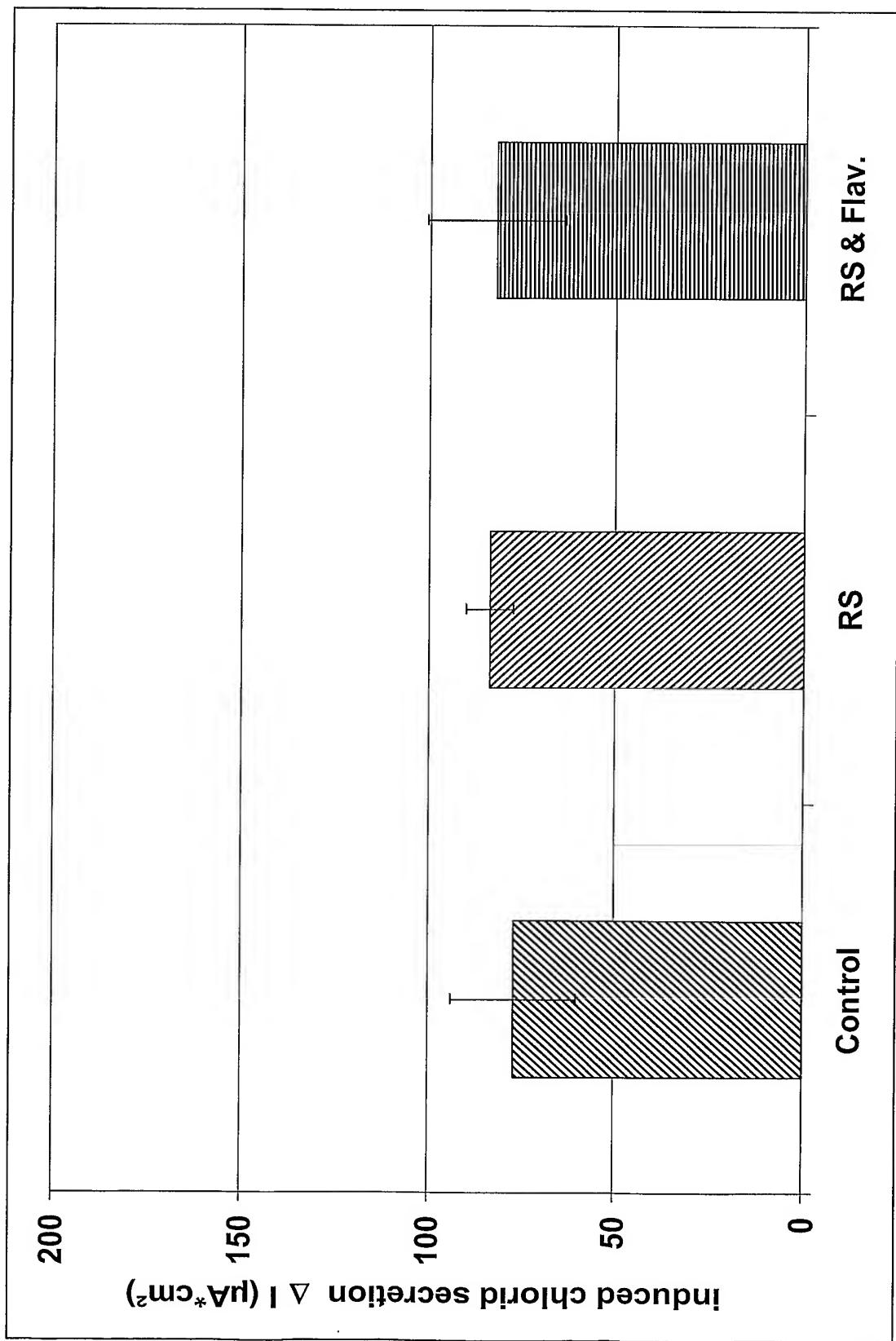


Fig. 3. PGE₂/theophyllin induced chloride secretion measured on partially striped proximal colon wall of healthy rats, feeding control, RS or RS/Flavonoide (Rutin) containing feed. (MV \pm SEM, n=6).

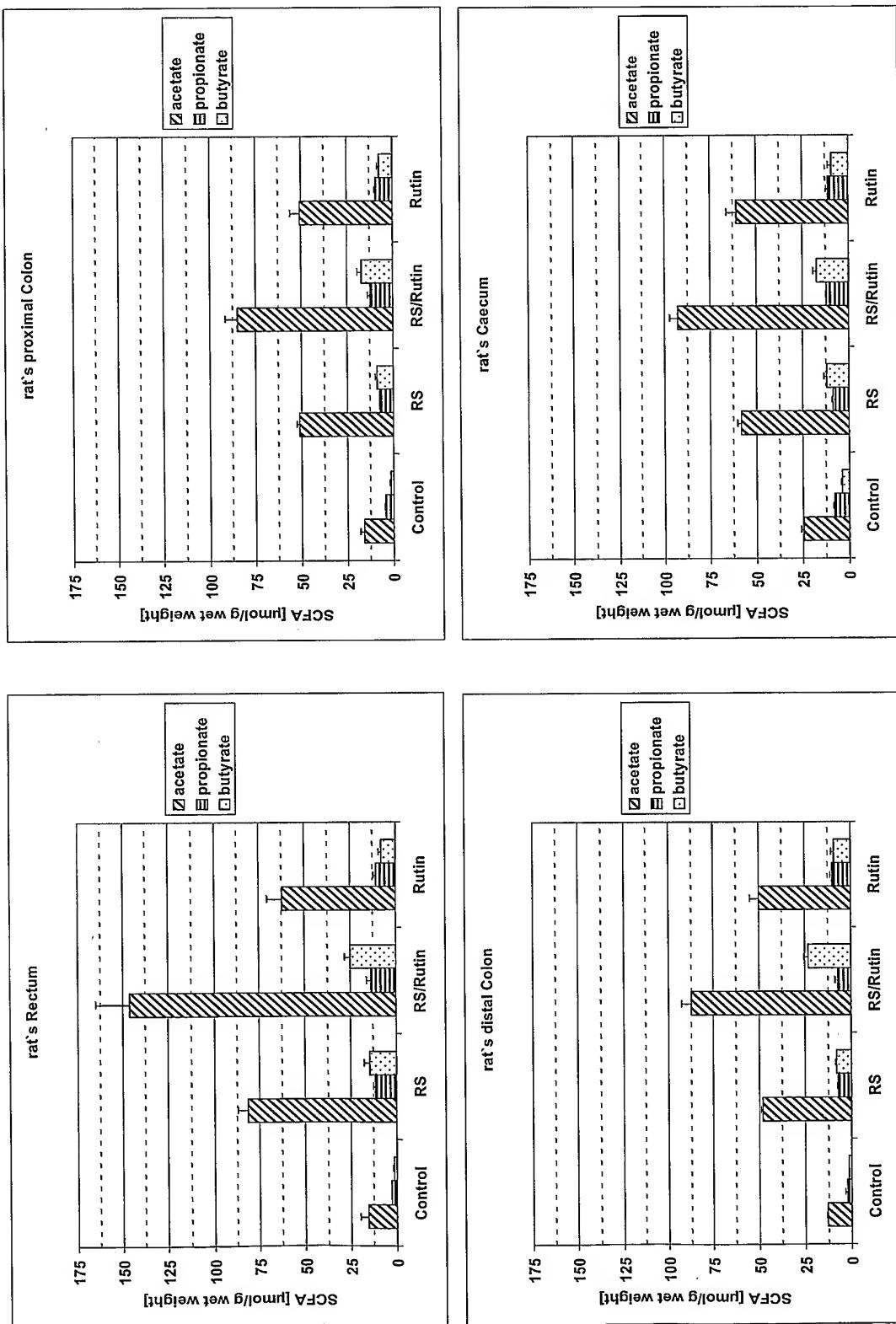


Fig. 4. Levels of SCFAs ($\mu\text{mol/g}$ wet = fresh weight) in caecum, proximal and distal colon and rectum of rats, feeding control, RS, RS/Rutin or Rutin containing feed. ($\text{MV} \pm \text{SEM}$, Control: n=6, RS: n=8, RS/Rutin: n=8, Rutin: n=7).

5 / 7

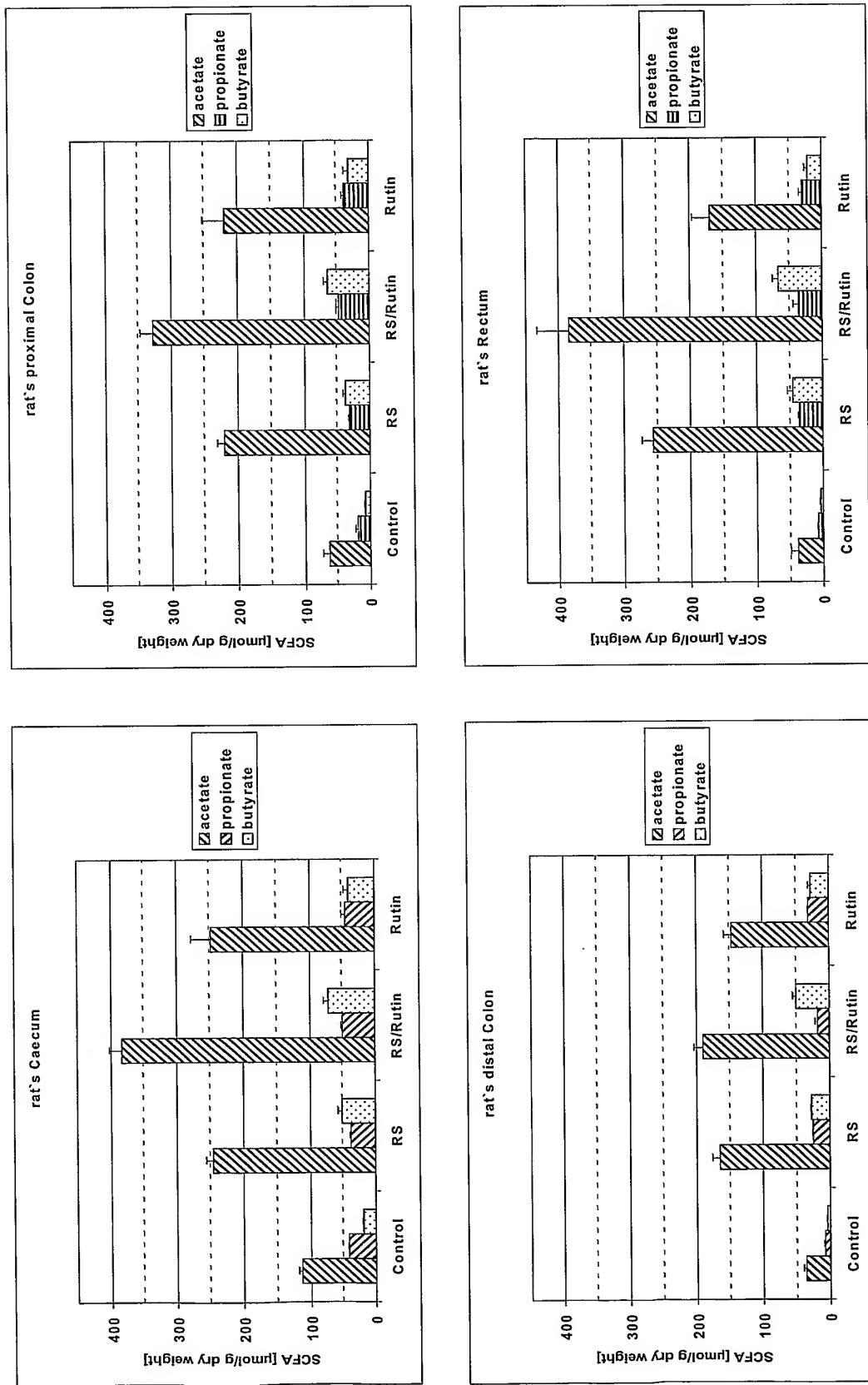


Fig. 5. Levels of SCFAs ($\mu\text{mol/g}$ dry weight) in caecum, proximal and distal colon and rectum of rats, feeding control, RS, RS/Rutin or Rutin containing feed. ($\text{MV} \pm \text{SEM}$, Control: n= 6, RS: n=8, RS/Rutin: n=8, Rutin: n=7).

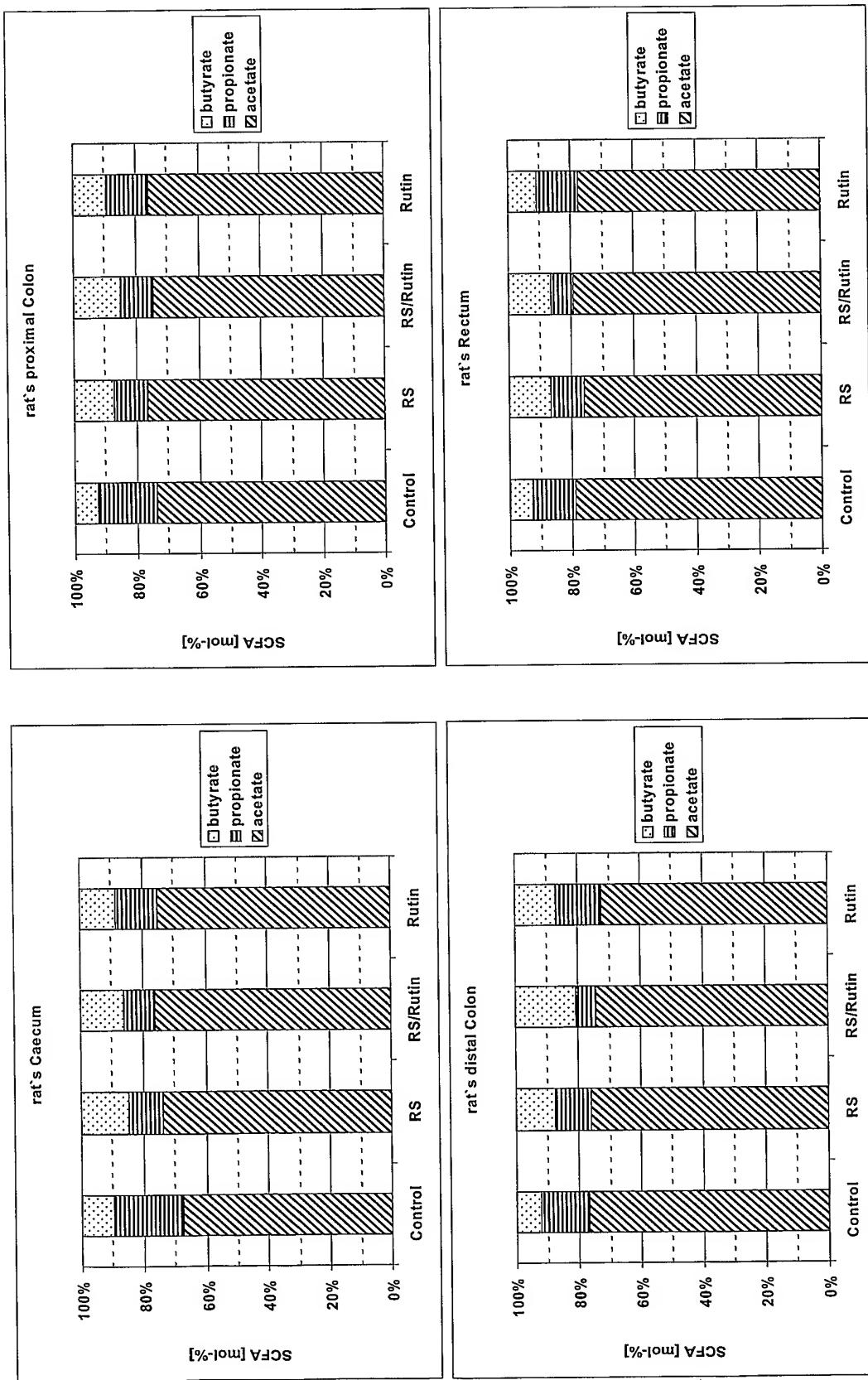


Fig. 6. Molar relation of short-chain fatty acids acetate, propionate and butyrate (mol-%) calculated from MV of fig. 4 in caecum, proximal and distal colon and rectum of rats respectively, feeding control, RS RS/Rutin or Rutin containing feed.
(Control: n= 6, RS: n=8, RS/Rutin: n=8, Rutin: n=7)

7 / 7

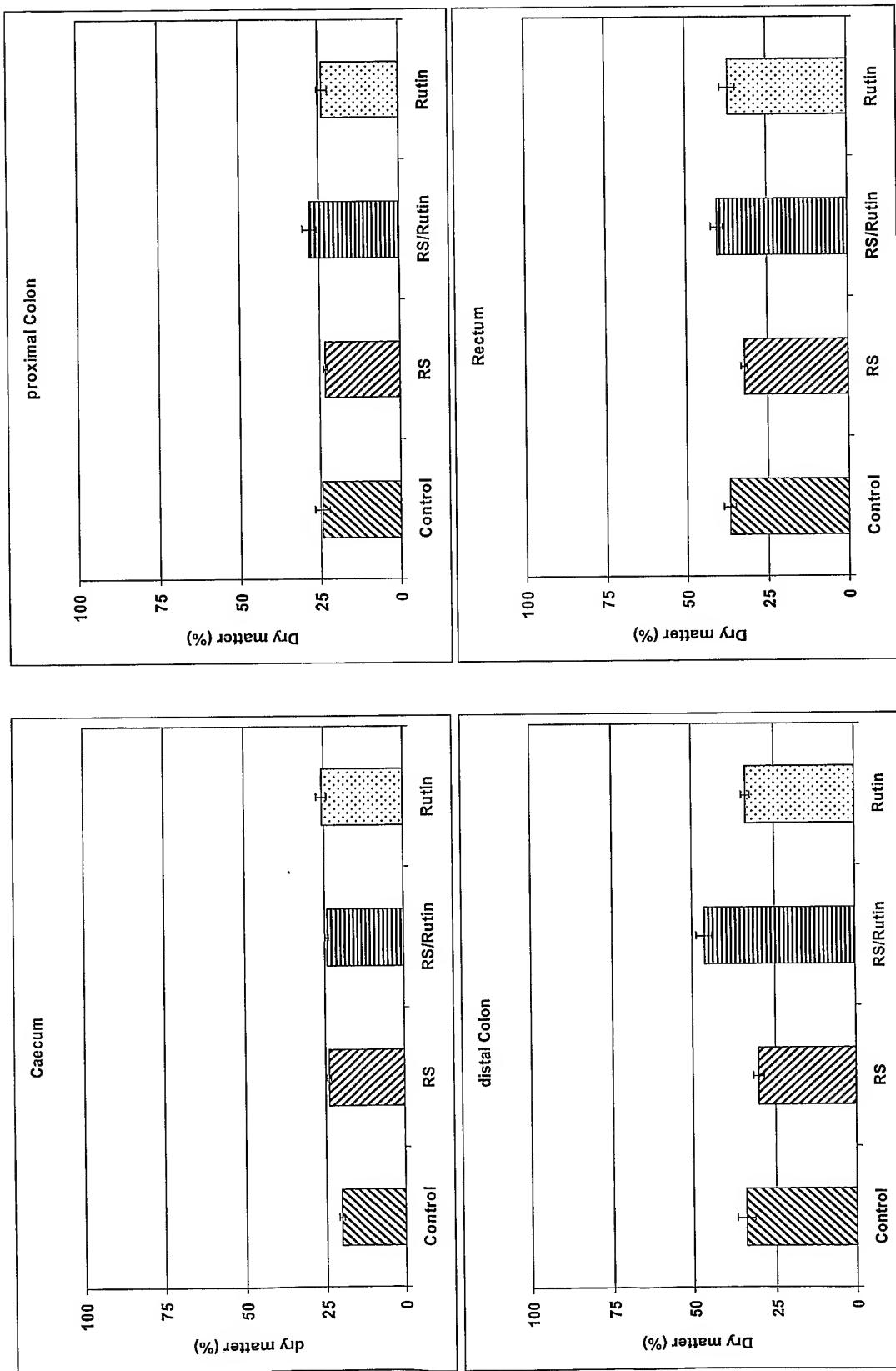


Fig. 7. Dry matter of the content of caecum, proximal and distal colon and rectum of rats, feeding control, RS, RS/Rutin or Rutin containing feed. ($MV \pm SEM$, Control: n= 6, RS: n=8, RS/Rutin: n=8, Rutin: n=7).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/00475

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/70 A61K31/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, FSTA, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JACOBASCH GISELA ET AL: "Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases." INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE, vol. 14, no. 4-5, November 1999 (1999-11), pages 201-211, XP009011371 ISSN: 0179-1958 Y page 204, right-hand column, paragraph 6 -page 205, left-hand column, paragraph 1 ----- -/-	1-12
Y		1-12

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

23 May 2003

10/06/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Loher, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/00475

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JACOBASCH GISELA ET AL: "Suppression of carcinogenesis in the intestines of Min mice by resistant starch, nonsteroidal antiinflammatory drugs and flavonoids." EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 72, no. SUPPL. 43, 1997, page 44 XP009011381 Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft fuer Zellbiologie; Halle, Germany; March 16-20, 1997 ISSN: 0171-9335 abstract ---	1-12
X	DATABASE FSTA 'Online! INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANFURT/MAIN, DE; Accession-Number: 1998-09-m1099, 1998 KREFT: "New nutritional aspects of buckwheat based products" XP002242290 abstract ---	11,12
Y		1-10
X	MITSUYAMA K ET AL: "Treatment of ulcerative colitis with germinated barley foodstuff feeding: A pilot study." ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, vol. 12, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 1225-1230, XP002242288 ISSN: 0269-2813 Diskussion figures 1-3 ---	1-12
X	US 5 858 371 A (SINGLA ANIL KUMAR ET AL) 12 January 1999 (1999-01-12) claim 2 ---	1-3,5, 11,12
X	WO 02 060393 A (THEOHARIDES THEOHARIS C) 8 August 2002 (2002-08-08) example 2; table 1 ---	1-3,5, 11,12
Y	CRUZ T ET AL: "Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats." LIFE SCIENCES, vol. 62, no. 7, 9 January 1998 (1998-01-09), pages 687-695, XP002242289 ISSN: 0024-3205 page 687, paragraph 2 page 691, paragraph 2 -page 692, paragraph 1 ---	1-12
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 03/00475

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE EMBASE 'Online! ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 2000</p> <p>LAMSON D W ET AL: "Antioxidants and cancer III: Quercetin" Database accession no. EMB-2000227928 XP002242291 abstract & ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW 2000 UNITED STATES, vol. 5, no. 3, 2000, pages 196-208, ISSN: 1089-5159</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE03/00475**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

SEE SUPPLEMENTAL SHEET

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCT/ISA/ 210

Box I.1

Although Claims 1-10 relate to a method for treating a human or animal body, the search has nevertheless been carried out on the basis of the stated effects of the composition.

PCT Rule 39.1(iv) – Method for treating a human or animal body by therapy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/00475

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5858371	A	12-01-1999	AU 698407 B2	29-10-1998
			CN 1219390 A ,B	16-06-1999
			ZA 9702900 A	03-11-1997
WO 02060393	A	08-08-2002	US 2002176902 A1	28-11-2002
			WO 02060393 A2	08-08-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/00475

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K31/70 A61K31/715

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, FSTA, PAJ, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JACOBASCH GISELA ET AL: "Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases." INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE, Bd. 14, Nr. 4-5, November 1999 (1999-11), Seiten 201-211, XP009011371 ISSN: 0179-1958 Seite 204, rechte Spalte, Absatz 6 -Seite 205, linke Spalte, Absatz 1 ---	1-12
Y	Seite 204, rechte Spalte, Absatz 6 -Seite 205, linke Spalte, Absatz 1 ---	1-12 -/-

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

23. Mai 2003

10/06/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5018 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Loher, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/00475

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JACOBASCH GISELA ET AL: "Suppression of carcinogenesis in the intestines of Min mice by resistant starch, nonsteroidal antiinflammatory drugs and flavonoids." EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd. 72, Nr. SUPPL. 43, 1997, Seite 44 XP009011381 Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft fuer Zellbiologie; Halle, Germany; March 16-20, 1997 ISSN: 0171-9335 Zusammenfassung ---	1-12
X	DATABASE FSTA 'Online! INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANFURT/MAIN, DE; Accession-Number: 1998-09-m1099, 1998 KREFT: "New nutritional aspects of buckwheat based products" XP002242290 Zusammenfassung ---	11,12
Y		1-10
X	MITSUYAMA K ET AL: "Treatment of ulcerative colitis with germinated barley foodstuff feeding: A pilot study." ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, Bd. 12, Nr. 12, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 1225-1230, XP002242288 ISSN: 0269-2813 Diskussion Abbildungen 1-3 ---	1-12
X	US 5 858 371 A (SINGLA ANIL KUMAR ET AL) 12. Januar 1999 (1999-01-12) Anspruch 2 ---	1-3,5, 11,12
X	WO 02 060393 A (THEOHARIDES THEOHARIS C) 8. August 2002 (2002-08-08) Beispiel 2; Tabelle 1 ---	1-3,5, 11,12
Y	CRUZ T ET AL: "Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats." LIFE SCIENCES, Bd. 62, Nr. 7, 9. Januar 1998 (1998-01-09), Seiten 687-695, XP002242289 ISSN: 0024-3205 Seite 687, Absatz 2 Seite 691, Absatz 2 -Seite 692, Absatz 1 ---	1-12
	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/00475

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE EMBASE 'Online! ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 2000 LAMSON D W ET AL: "Antioxidants and cancer III: Quercetin" Database accession no. EMB-2000227928 XP002242291 Zusammenfassung & ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW 2000 UNITED STATES, Bd. 5, Nr. 3, 2000, Seiten 196-208, ISSN: 1089-5159</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 03/00475

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. — weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle Internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 1-10 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Zusammensetzung.

Fortsetzung von Feld I.1

Regel 39.1(iv) PCT – Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/00475

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
US 5858371	A 12-01-1999	AU 698407 B2	CN 1219390 A ,B	ZA 9702900 A	29-10-1998 16-06-1999 03-11-1997
WO 02060393	A 08-08-2002	US 2002176902 A1	WO 02060393 A2		28-11-2002 08-08-2002